

(甲種)

論 文 要 旨

学 位 論 文

表 題 神経膠芽腫における BBOX1 を介した腫瘍増殖に関する代謝調節機構の研究

申 請 者 氏 名 澤口 武尊

担当指導教員氏名 遠藤 仁司 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
_____人間生物学系
_____生体分子医学
_____分子生化学

使用文字数3094字

論文要旨

氏名 澤口 武尊

表題

神経膠芽腫における BBOX1 を介した腫瘍増殖に関する代謝調節機構の研究

1 研究目的

多形性神経膠芽腫 (GBM) は侵攻性の高い脳腫瘍であり、最も致死率の高いヒト腫瘍のひとつである。現在使われている標準治療を受けた GBM 患者でも全生存期間の中央値が 12~15 ヶ月と予後不良であるため、より強力な治療戦略の確立が望まれている。代謝リプログラミングは、脳腫瘍を含む多くの腫瘍で認められることから、GBM における共通のがん代謝パターンを明らかにすることは、新たな治療標的の探索につながる可能性がある。

生体内でのカルニチンの重要な役割の一つは、カルニチンシャトルにより長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に輸送することである。ミトコンドリア内に輸送された長鎖脂肪酸は、主に脂肪酸酸化 (β 酸化) を受け、エネルギー産生に使用される。

イソクエン酸脱水素酵素 1/2 (IDH1/2) に変異を持つ脳腫瘍患者の生存期間は、野生型 IDH1/2 を持つ脳腫瘍患者の生存期間よりも有意に長く、予後良好である。当研究室では以前、脳腫瘍サンプルのメタボローム解析を行い、IDH1 に変異を持つ脳腫瘍サンプルでは、野生型 IDH1 を持つ脳腫瘍サンプルと比較して、カルニチンとアシルカルニチンが有意に減少していることを報告した。変異型 IDH1/2 は、 α -ケトグルタル酸 (α -KG) から 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) を生成する。2-HG は、 α -KG 依存性ジオキシングナーゼ群の 1 つであり、カルニチン生合成経路の律速酵素である γ -ブチロバチンジオキシングナーゼ (BBOX1) を阻害する。以上より、2-HG の腫瘍抑制作用における鍵酵素はカルニチン合成系の最終酵素である BBOX1 であることが示唆される。本研究では、IDH を有する GBM に対する BBOX1 野生型阻害を治療標的とすることへの妥当性を検証することを目的とした。

2 研究方法

本研究では野生型 IDH を有するヒト神経膠腫細胞株 U87MG および LN229 をモデル細胞として使用した。まずゲノム編集技術を用いて BBOX1 遺伝子を欠失した細胞株 (BBOX1-KO) と CAG プロモーター制御下に BBOX1 を過剰発現する細胞株 (BBOX1-OE) を作製した。これらの細胞株を用いて通常のカルニチン含有ウシ胎児血清 (FBS) を用いた培養条件下で細胞増殖能を検討した。次に、血清由来のカルニチンの影響を排除するため、カルニチン不含の透析ウシ胎児血清 (dFBS) を用いた培養条件下で実験を行った。これらの細胞株にカルニチンまたは BBOX1 阻害剤 (カルニチン合成阻害) であるメルドニウムを添加し、増殖に対する影響を検討した。さらに、より腫瘍内の微小環境を模倣すると考えられるスフェロイド形成能を測定し、細胞内で合成されるカルニチンの腫瘍スフェロイド形成に与える影響を検討した。神経膠芽腫細胞内で合成されたカルニチンの脂肪酸酸化に対する影響を調べるため、U87 細胞について細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度

(OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) を測定した。最後に、同所性細胞株異種移植 (CDX) マウスモデルを用いて *in vivo* における腫瘍形成の検討を行った。CRISPR-Cas9 システムを用いて、NOD/Scid マウスに BBOX1 と IL-2 受容体 γ (Il2rg) を二重に欠損させたマウス系統 (Il2rg/Bbox1 KO) を樹立し、内在性のカルニチン供給を遮断した移植用マウスを確立した。このマウスの脳内に U87BBOX1-OE 細胞株およびコントロール細胞株を移植し、BBOX1 が腫瘍増殖に及ぼす影響を検討した。

3 研究成果

FBS を用いた培養条件下で U87 コントロール細胞と U87BBOX1-OE 細胞の増殖能に有意差はみられなかった。次に、dFBS を用いた培養条件下では、野生型 U87 細胞へのカルニチンの添加により無添加と比較して増殖が促進した。U87BBOX1-KO 細胞では野生型 U87 細胞と比較して、透析血清培地での増殖が抑制した。また、U87BBOX1-OE 細胞および LN229BBOX1-OE 細胞はコントロール細胞に比べ増殖の促進が認められ、メルドニウムの添加では、無添加の細胞と比較して増殖の抑制が確認された。U87BBOX1-OE 細胞および LN229BBOX1-OE 細胞は、対応するそれぞれのコントロール細胞と比較し、腫瘍スフェロイド形成能が増大した。細胞外フラックスアナライザーを用いた解析では、L-アスパラギン酸と L-グルタミン酸を加えた測定培地に脂肪酸やグルコースを順次加えていく系を用いて野生型 U87 細胞と U87BBOX1-KO 細胞の OCR と ECAR の測定を行った。野生型 U87 細胞では、U87BBOX1-KO 細胞と比較してオレイン酸 (OA) を加えると OCR が上昇した。さらに、同じ測定培地で培養した U87BBOX1-OE 細胞にポート A でピルビン酸又は測定培地のみ、ポート B で OA、ポート C でグルコースを順次添加し、OCR と ERCA を経時的に測定した。ピルビン酸存在下での OA 添加では OCR が有意に上昇したが、非存在下では認められなかった。さらにグルコースを添加すると OCR に差は無くなった。この結果から、脂肪酸代謝の結果生じたアセチル CoA と、ピルビン酸の添加による補充反応の促進によって生じたオキサロ酢酸の増加により、クエン酸合成が促進され、TCA 回路の活性化により OCR が増大したと考えられた。一方、ECAR はピルビン酸添加の有無にかかわらず OA 添加後に差は認められなかったが、グルコース添加後の ERCA の上昇はピルビン酸を含む条件で低く抑えられた。これは、ピルビン酸の添加によりアセチル CoA とオキサロ酢酸から生じるクエン酸が増加し、解糖系の律速酵素であるホスホフルクトキナーゼ 1 のクエン酸による阻害を介して解糖系が抑制された結果と考えられた。最後に *in vivo* での腫瘍形成の測定を行った。カルニチン不含の飼料を与えた Il2rg/Bbox1 KO マウスに U87BBOX1-OE 細胞と U87 コントロール細胞の同所性異種移植を行い、腫瘍形成能は移植細胞に発現するルシフェラーゼ活性を経時的に測定することにより検討した。U87BBOX1-OE 細胞と U87 コントロール細胞との間の腫瘍増殖の差は、移植後 35 日で明らかになり、その後さらに U87BBOX1-OE 細胞を移植したマウスで増大が顕著になった。

4 考察

本研究では、BBOX1 を神経膠芽腫細胞に安定発現させると脂肪酸酸化の活性化により腫瘍細胞の増殖が促進されること、レシピエントや飼料からのカルニチン補充が制限された CDX マウスモデルにおいて神経膠芽腫細胞に発現する BBOX1 が腫瘍形成を促進することを示した。GBM のような進行性の腫瘍は、生存のために特定の代謝経路に依存するため、代謝再プログラミングは新規治療法を開発するための標的となりうる。アシル-CoA 結合タンパク質 (ACBP) は、ミトコンドリアへの輸送のために中鎖および長鎖脂肪酸アシル-CoA と高い親和性で結合する。GBM では高発現しており、ACBP をノックダウンすると、脂肪酸酸化活性が低下し、培養での腫瘍増殖が抑制され、同所性異種移植マウスの生存期間が延長する。GBM の浸潤も、ACBP 欠損 GBM では *in vitro* および同所異種移植マウ

スで阻害されることが報告されている。これらの結果は、脂肪酸酸化が悪性神経膠腫の治療標的となることを強く示唆している。

カルニチンは、長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの輸送に不可欠な補因子であり、大部分は食事から摂取されるが、BBOX1 を発現する肝臓、腎臓、脳でも内因性に合成される。BBOX1 は血管の発達が不十分なためにカルニチンの供給が不十分な固形腫瘍で発現している可能性がある。このような条件下では、癌細胞の生存に有利となり、進行や転移をさらに促進する。従って、BBOX1 は、GBM のように、現在の治療レジメンでは予後不良な腫瘍のタイプにおいて、薬剤開発の良い候補となる可能性がある。

5 結論

GBM に発現する BBOX1 が、*in vitro* では腫瘍増殖と腫瘍スフェロイド形成を促進し、*in vivo* ではカルニチン供給が制限された CDX モデルマウスにおける腫瘍形成を促進することを証明した。以上の結果は、腫瘍細胞自体が供給するカルニチンによる脂肪酸酸化活性の上昇に起因すると考えられる。本研究による発見は、難治性の神経膠腫や悪性腫瘍に対する新しい治療法を確立するための新たな方法を提供すると考えられる。